基于通径分析的低营养水体环境中芽孢杆菌生长与氮转化影响因素研究*

黄海洪[1,§]，李朝云[2,§,†]，类延菊[1,3]，邹万生[1,4]，杨品红[1,5]，武孟祥[6]

（1. 湖南文理学院，常德 415000；2. 山东畜牧兽医职业学院，潍坊 261061；3. 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室，常德 415000；4. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心，常德 415000；5. 动物学湖南省高校重点实验室，常德 415000；6. 鼎城区气象局，常德 415000）

摘要：

［目的］ 芽孢杆菌在养殖水体等低营养水环境中氮的转化治理方面具有较高的应用价值，但受很多因素的影响，其中又数菌株特性和环境条件较为重要，然而目前对这两种因素的综合研究尚少，基于通径分析的低营养水体环境中芽孢杆菌生长与氮转化影响因素进行分析研究。

［方法］ 为此，选取2株芽孢杆菌NT9和YB3作为研究对象，通过平板法测定其水解酶活性和抑菌活性等特性，然后模拟配置了4种低营养水体环境，并应用通径分析方法研究菌株特性和环境条件对芽孢杆菌生长和氮转化作用的影响，如直接效应、间接效应和综合效应等。

［结果］ 结果显示，菌株NT9为枯草芽孢杆菌（*Bacullis subtilis*），与蜡样芽孢杆菌（*B. cereus*）YB3不同，具有较强的蛋白酶、淀粉酶活性以及抑菌活性，而纤维素酶活性较弱。同时又与菌株YB3相似，在低营养条件下菌株NT9也仅具有有机氮和氨氮降解作用，其中氨氮降解率可达89.3%。通径分析显示，模型的决定系数为0.55-0.95，其它主要的适配度指标也均符合判定标准。菌株的纤维素酶活性（*cel*）对大多数环境中菌株的生长（*gro*）以及有机氮、氨氮的降解（*dtan*）均具有显著的直接促进效应（$P<0.001$）。水体起始的菌量（*iod*）、有机氮含量（*ion*）、氨氮含量（*itann*）以及时间阶段（*stage*）等环境因素对*gro*和*dtan*也具有显著的直接影响（$P<0.05$），但仅限于某些特定的环境。菌株活性与环境因素之间也具有交互作用（$P<0.05$），对*gro*和*dtan*产生间接效应，增强或抵消直接效应，使某些因素表现出显著的总效应（$P<0.05$），但也导致其它因素的总效应不显著（$P>0.05$）。*gro*和*dtan*在某些环境中相互之间也具有直接的促进效应（$P<0.001$），并且也相互间接影响。研究表明，菌株特性和环境因素的综合作用对低营养水体中芽孢杆菌的生长和氮转化作用具有重要影响，但是在不同的环境中作用的方式不同。

［结论］ 因此，在实际应用中，可能需要结合菌株特性和环境条件拟定具体方案，如菌株、氮源的投加量和投加方式等，以达到更好的使用效果。

关键词：芽孢杆菌；低营养水体；生长；氮转化；影响因素；通径分析

文章编号：S959　　**中图分类号：X172**　　**文献标识码：A**

Path analysis for factors affecting the growth and nitrogen conversion of *Bacillus* in low-nutrition-level water conditions

HUANG Haihong[1,§], LI Chaoyun [2,§,†], LEI Yanju[1,3], ZOU Wansheng[1,4], YANG Pinhong[1,5], Wu Mengxiang[6]

(1. Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China; 2. Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China; 3. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries, Changde 415000, China; 4. Key Laboratory of Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area, Changde 415000, China; 5. Zoology Key Laboratory of Hunan Higher Education, Changde 415000, China; Dingcheng District Meteorological Bureau, Changde 415000, China)

Abstract:

本文系湖南省教育厅科学研究优秀青年项目“养殖水体低营养条件下芽孢杆菌高效氮转化机理研究与应用”（18B394）的研究成果之一

§ 通讯作者

† 共同第一作者

[Objective] *Bacillus* is very useful to nitrogen conversion in water with low nutrition level, such as aquaculture waterbody. And this process generally affected by many factors, among which the characteristics of both factors of *Bacillus* strains and environments are the most important ones. However, few researches could be obtained in regard to the comprehensive effects of those two aspects.
[Methods] Thus, in the present study, hydrolytic and bacteriostatic activities of two *Bacullis* strains NT9 and YB3 were determined by using plate methods. Thereafter, four low-nutrition-level water conditions were prepared artificially, and the effects of characteristics of *Bacillus* strains and environments on bacterial growth and nitrogen conversion were researched simultaneously, by separating out the total, direct and indirect effects of both aspects were with path analysis method.
[Results] Results showed that unlike *B. cereus* strain YB3, strain NT9 was a *B. subtilis* possessed stronger proteolytic, amylolytic and bacteriostatic activities but with a weaker cellulase activity. However, as similar as strain YB3, strain NT9 could degrade organic nitrogen and ammonia, with a high of the ammonia-conversion rate of 89.3% under low nutrition condition. Results from path analysis showed that in models the main goodness-of-fit indices were all suitable, with high determination coefficients (R^2) of 0.55-0.95. The cellulase activity (*cel*) of *Bacillus* strains displayed significant direct positive effects on bacterial growth (*gro*) and degradations of organic nitrogen and ammonia (*dtan*) in most of the four water conditions (P<0.001). The environmental factors, such as the initial bacterial counts (*iod*), organic nitrogen content (*ion*), ammonia content (*itann*) and time duration phase (*stage*) also executed significant direct positive effects on *gro* and *dtan* (P<0.05), but only for some special conditions. There were interactions among *Bacillus* activities and environmental factors, which produced indirect effects on *gro* and *dtan*, and in turn reinforced or weakened their direct effects, resulting in final significant (P<0.05) or non-significant (P>0.05) total effects of factors. Meanwhile, in some environments, *gro* and *dtan* could significantly and directly improved each other (P<0.001), or produced indirect effects on each other.
[Conclusions] In conclusion, the characteristics of strain and environment could intensively affect the growth and nitrogen conversion of *Bacillus*, with different pattern in different water conditions, indicating that for better application of *Bacillus*, strategies should be made and adjusted according to water conditions, such as dosages and durations of strain and nitrogen sources.
Key words: *Bacullis*; Low nutrition water; Growth; Nitrogen conversion; Factors; Path analysis

1 引言

由于水产养殖过程需要投入大量的人工配合饲料，导致养殖水体氮元素的富集，虽然浓度较其它污水低，富营养化的风险仍然非常高。据估计，水产养殖水体中78%的氮元素来自于饲料(Fungesmith and Mrp, 1998; 齐振雄等, 1998)，并且主要以有机氮的形式存在(Burford and Williams, 2001)，主要是因为养殖过程中大约70-80%的饲料蛋白氮流失到水环境中(Avnimelech and Kochba, 2009; Piedrahita, 2003)。另外，这些饲料蛋白氮被微生物降解为氨氮、亚硝酸氮等有毒无机氮，也对水产动物的健康产生负面影响(Lin and Chen, 2001; Lin and Chen, 2003)，甚至关系到养殖能否成功。因此，水体中氮的转化处理历来都是水产领域实现可持续发展以及健康养殖所重点关注的问题。

芽孢杆菌（*Bacullis* sp.）具有多种活性功能，如分泌蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等，能够加快养殖水体氮的转化，降低氮元素的积累，并减少氨氮、亚硝酸盐等的含量(Elsabagh *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2016)，在水产养殖中具有较大的应用价值(Rafael Martinez-Cordova *et al.*, 2017)。但是，芽孢杆菌的氮转化效果受很多因素的影响，如温度、pH、溶解氧、氮源、碳源等培养条件(Gao *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; 谢凤行等, 2012)，以及生长能力、水解酶活性和抑菌活性等菌株本身的特性(周广静等, 2017)。本团队前期对芽孢杆菌在模拟养殖水体中的生长和氮转化也进行了研究，发现不同来源的菌株具有不同的生长模式与氮转化模式，推测菌株水解酶活性、抑菌活性等方面的差异，以及水体菌量和营养状况（如氮源水平）等环境因素差异可能是造成这种差别的主要原因，但是尚未对其影响程度

进行量化研究(黄海洪等, 2019)。

养殖水体中影响芽孢杆菌生长和氮转化效果的因素相对比较复杂，单因素研究(Gao *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2011; 谢凤行等, 2012)难以同时对各种因素进行综合分析以及定量比较，而多因素研究又可能存在效应混杂，不能真正揭示因子的作用。通径分析又称路径分析（path analysis），是一种多元统计技术，可以通过剖分将效应分解为标准化的直接作用和间接作用，减少效应混杂，而且能够直观比较各种因素的作用大小，为主要因素的提取与研究提供参考依据，适合进行多因素的综合分析与比较，已在多个领域中广泛应用(吴明隆, 2018; 薛宝宝等, 2018)，但是在养殖水体芽孢杆菌生长和氮转化方面尚未见报道。

因此，本文应用通径分析方法，在前期基础上，研究菌株特性和环境因素对2株不同来源的芽孢杆菌NT9和YB3生长和氮转化的综合影响，并进行效应剖分和定量分析，提炼影响芽孢杆菌氮转化效果的主要因素，探讨促进氮转化效果的可能途径，以期为芽孢杆菌在养殖水体中的应用研究提供新的手段，并为其高效氮转化应用探索理论依据。

2　材料与方法

2.1　菌种

菌株 NT9 和菌株 YB3 均为“环洞庭湖水产健康养殖及加工”湖南省重点实验室保藏菌种。其中，菌株 NT9（GenBank Accession No. KX891556）是一株枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*），从传统发酵食品腊八豆中分离得到（黄海洪等，2022），菌株 YB3（GenBank No. KX578018）从养殖水体分离得到，为蜡样芽孢杆菌（*B. cereus*）(黄海洪等, 2018)。两株菌的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性见文献（黄海洪等，2022）。

2.2　培养基

LB 培养基：大豆蛋白胨 10.0 g，酵母粉 5.0 g，葡萄糖 10.0 g，NaCl 5.0 g，水 1000 mL，pH 7.0，固体培养基添加琼脂粉 12.0 g，121 ℃灭菌 30 min。

2.3　低营养条件下菌株纯培养试验

(1) 低营养培养液制备与菌株培养

参照黄海洪等 (2018)所述方法进行，稍作修改。分别以尿素和氯化铵（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）为唯一氮源，配制浓度为 0.01%（*w/w*）低氮源营养培养液，以 0.1%（*w/w*）的葡萄糖为碳源，过滤除菌。接种芽孢杆菌菌悬液，使起始 OD_{600} 为 0.010，30 ℃，150 r·min^{-1} 振荡发酵 24d。

(2) 生长吸光度与无机氮含量测定

每 4 d 取芽孢杆菌的发酵液，12000 r·min^{-1}，4 ℃，离心 20 min，沉淀用 0.6%无菌生理盐水漂洗 3 次，等体积重悬、混匀，测定 OD_{600}，重复 3 次。同时采用纳氏试剂法、盐酸萘乙二胺法和紫外分光光度法，测定氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的浓度(国家环境保护总局, 2002)，重复 3 次。

2.4　模拟养殖试验

模拟养殖试验参考黄海洪等 (2019)所述方法进行，稍作修改。

(1) 模拟养殖水体制备

12 个 200 L 高密度聚乙烯（HDPE）塑料桶分别装入 100 L 自来水（pH 7.20），用碳酸氢钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）将 pH 调至 8.00 左右，再以 10 mg·L^{-1} 二氧化氯消毒，24 h 后用维生素 C（1 mg·L^{-1}）中和、解除毒性(Lara *et al.*, 2017; Prata Gaona *et al.*, 2017)，备用。

(2) 种子液制备和水体接种

菌株接种于 LB 液体培养基，30 ℃，150 r·min^{-1}，培养 24 h，制备种子液。种子液按 1:100 的比例转接到新鲜的 LB 液体培养基，30 ℃，150 r·min^{-1}，培养 24 h，然后 12000 r·min^{-1}，4 ℃，离心 10 min，沉淀用 0.6%无菌生理盐水洗涤，重悬，添加到 6 个模拟养殖水体中，使水体起始总菌量为 1.0 × 10^{6} cfu·mL^{-1}。接种菌株 NT9 和 YB3 的水体分别称为 NT9 水体和 YB3 水体。

(3) 模拟养殖

凡纳滨对虾人工配合饲料（粗蛋白质≥40.0%，粗脂肪≥5.0%，粗纤维≥5.0%，粗灰分≤16.0%，水分≤12.0%，澳华公司）粉碎，过 100 目筛，投入上述水体，试验前 3 天的投喂量为 2.0 $g·d^{-1}$，其他时间均为 1.0 $g·d^{-1}$，第 8 d 和 20 d 未投喂，试验周期为 24 d。试验期间不换水，使用气石不间断充气。

(4) 水质测定

溶解氧、温度、pH 使用 YSI-550A 多功能水质分析仪（YSI 公司，美国）测定，于每天 8:00 和 18:00 各进行一次。其它水质指标每 4d 测定一次，水体氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、碳酸盐碱度和钙镁硬度参照文献(国家环境保护总局, 2002)进行。水体总菌量也每 4d 测定一次，采用平板计数法进行。

2.5 数据分析

数据均以（mean ± SD）的形式表示。应用 SPSS 22.0 软件（IBM 公司，美国）检验数据的正态性（Shapiro-Wilk’s test）和方差齐性（Levene’s test），之后进行 student 检验（*t* 检验）。总菌量需经过 $log_{10}()$转换，再进行检验。对不服从方差齐性的数据则采用 Mann-Whitney U Test 进行非参数检验。

通径分析参照杜家菊和陈志伟 (2010)所述方法进行，稍作修改。首先，将24 d的试验周期分成6个阶段，每个阶段为4 d，分别以各阶段水体总菌的变化量（*gro*，代表生长量，$log_{10}()$转换值）或氨氮的变化量（*dtan*，代表有机氮和氨氮的降解，表现为氨氮的生成和降解，以N计，$mg·L^{-1}$）作为因变量。以4个环境因素作为自变量，起始菌量（*iod*），用各阶段起始总菌量的$log_{10}()$转换值表示，代表了参与菌株基数；起始氮源含量，包括起始有机氮含量（*ion*，以N计，$mg·L^{-1}$，为一次性投入的或分批次投入的氮量），和起始无机氮含量（*itann*，以N计，$mg·L^{-1}$，为测定的各试验阶段开始时测定的氨氮含量）；时间阶段（*stage*），即试验阶段，用试验周期每个阶段的终止时间点表示，如4、8、12、16、20和24 d，代表微生物的生长阶段，与微生物降解活力相关，也一定程度上反映了营养物质的消耗情况(黄海洪等, 2019)。同时，将菌株的3种水解酶活性和6种抑菌活性也都作为自变量纳入分析。然后，调用SPSS 22.0软件“Regression”程序，选择“Stepwise”方法进行多元回归分析，再应用AMOS 17.0软件（IBM公司，美国）进行路径图绘制、模型检验和效应剖分(吴明隆, 2018)。

3 结果

3.1 纯培养条件下菌株生长与氮转化

(1) 有机氮源培养基

图 1 显示，在以尿素作为唯一氮源的低浓度有机氮源培养基中，有氨氮累积和降解现象（*dtan*），但未检测到亚硝酸氮（nitrite）和硝酸氮（nitrate）的产生。菌株 NT9 使氨氮浓度由开始的(0.4±0.1) $mg·L^{-1}$ 上升至 16d 的(19.8±1.6) $mg·L^{-1}$（图 1a），总体的氨氮生成速率为 1.2 $mg·L^{-1}·d^{-1}$，而菌株 YB3 则使氨氮浓度由(0.6±0.1) $mg·L^{-1}$ 上升至 8d 的(27.7±3.0) $mg·L^{-1}$（图 1b），生成速率 3.4 $mg·L^{-1}·d^{-1}$。按照氨氮浓度变化方式，可以分为两个阶段（phase-1 和 phase-2），phase-1 主要是有机氮降解、氨氮生成的阶段，phase-2 为氮转化的阶段。

通径分析结果显示，在 phase-1 阶段，芽孢杆菌生长（*gro*）主要受纤维素酶活性（*cel*）、起始菌量（*iod*）、起始有机氮投入量（*ion*）和起始氨氮含量（*itann*）的影响（$P<0.001$，$R^2=0.94$，图 2a），而 *gro*、*iod*、*ion* 和培养阶段（*stage*）则对有机氮的降解（*dtan*）起决定性影响（$P<0.001$，$R^2=0.93$，图 2b）。效应剖分结果显示，*cel* 对 *gro* 直接效应（1.12，$P<0.001$）和总效应（0.64，$P<0.001$）最大（表 1），但是 *ion* 和 *itann* 的总效应不显著（$P>0.05$，表 1）；*iod* 对 *dtan* 的直接效应（1.19，$P<0.001$）和总效应（0.60，$P<0.001$）最大（表 2），然而 *ion* 和 *stage* 的总效应不显著（$P>0.05$，表 2）。

在 phase-2，芽孢杆菌生长（*gro*）主要受 *cel*、*dtan* 和 *itann* 的影响（$P<0.001$，$R^2=0.95$，图 3a），而氮转化作用（*dtan*）主要由 *cel*、*gro* 和 *iod* 决定（$P<0.001$，$R^2=0.91$，图 3b）。效应剖分显示，*itann* 对 *gro* 直接效应最大（0.50，$P<0.001$，表 3），而 *dtan* 的总效应最大（0.64，

P<0.001，表 3），但是 *cel* 的总效应不显著（*P*>0.05，表 3）；*cel* 和 *iod* 对 *dtan* 的直接效应较大（0.95，*P*<0.001；-1.10，*P*<0.001；表 4），但总效应均不显著（*P*>0.05，表 4），而 *gro* 的总效应最大（0.93，*P*<0.001，表 4）。

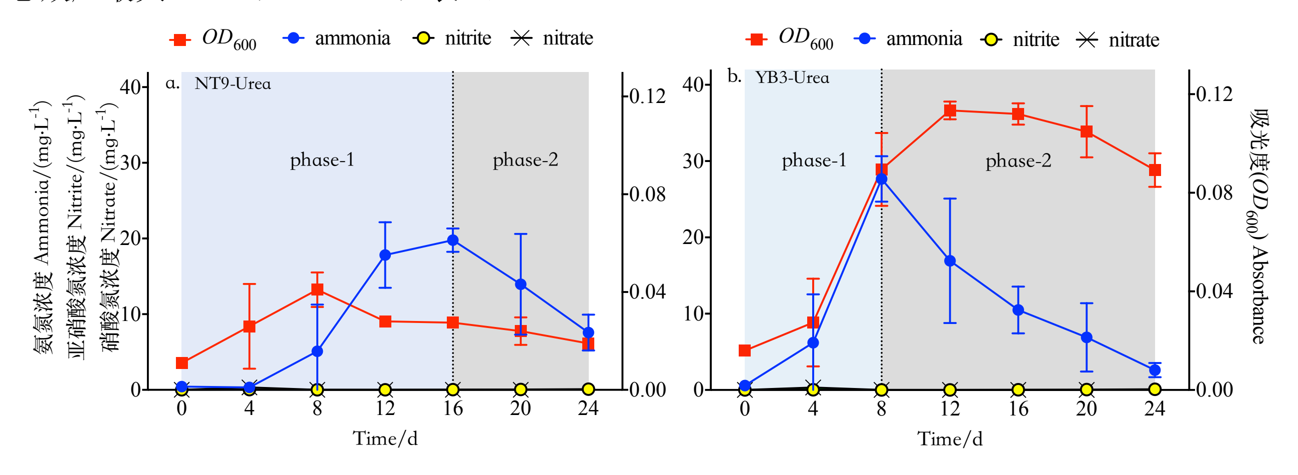


图 1　尿素培养基中菌株 NT9 和 YB3 的生长与氮转化情况

Fig. 1　The growth and nitrogen conversion of strain NT9 and YB3 in broth with urea as unique nitrogen source

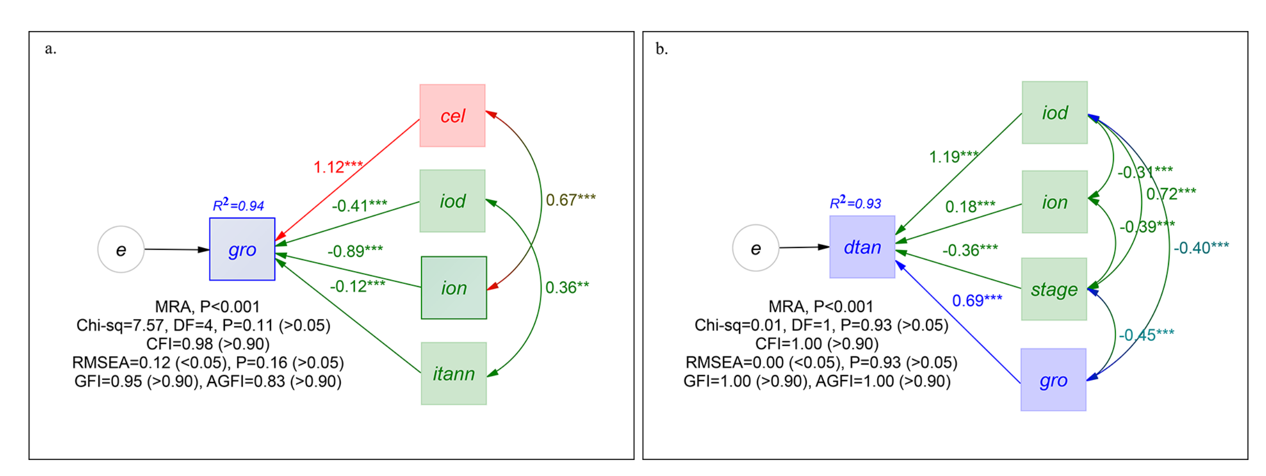


图 2　尿素培养基 phase-1 阶段芽孢杆菌生长（a）与氮转化（b）通径图

Fig. 2　The path diagrams of growth (a) and nitrogen conversion (b) of *Bacillus* strain in phase-1 of urea broth

（因变量上方数字表示决定系数（R^2），单箭头和双箭头上的数字分别代表通径系数（直接效应）和相关系数，*表示 *P*<0.05，**表示 *P*<0.01，***表示 *P*<0.001。图中左下角显示的是多元回归分析（MRA）假设检验 *P* 值，以及通径分析模型的适配度拟合指标，Chi-sq 为卡方值，DF 自由度，CFI 比较拟合指数，RMSEA 渐进残差均方根，GFI 适配度指数，AGFI 调整适配度指数，圆括号中显示的是指标的评价标准。红色框代表菌株活性，绿色框代表环境因素，蓝色框代表菌株生长和氮转化。下同。）

表 1　尿素培养基 phase-1 阶段芽孢杆菌生长影响因子的效应剖分

Table 1　The division of factors' effects on growth of *Bacillus* strain in phase-1 of urea broth

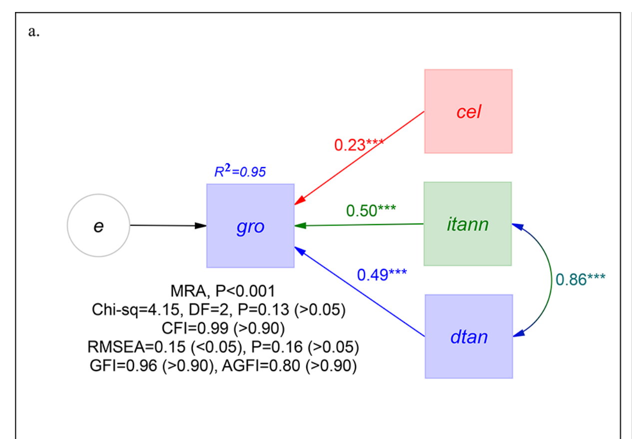
参数	总效应	直接效应	间接效应					未析效应
			cel	*iod*	*ion*	*itann*	合计	
cel	0.64***	1.12***	-	-	-0.60	-	-0.60	0.12
iod	-0.40**	-0.41***	-	-	-	-0.04	-0.04	0.05
ion	0.01^{ns}	-0.89***	0.75	-	-	-	0.75	0.15
itann	-0.24^{ns}	-0.12***	-	-0.15	-	-	-0.15	0.03

注：总效应和直接效应亦即分别为变量间的 Pearson 简单相关系数和通径系数（偏回归系数或标准化回归系数）；间接效应即间接通径系数，某个变量通过一个中间变量产生的效应，为两变量简单相关系数与中间变量通径系数的乘积；未析效应即总效应与直接效应和间接效应之差；间接效应与未析效应均未进行假设检验。*表示 *P*<0.05，**表示 *P*<0.01，***表示 *P*<0.001，^{ns} 表示 *P*>0.05。下同。

表 2　尿素培养基 phase-1 阶段芽孢杆菌氮转化影响因子的效应剖分

Table 2　The division of factors' effects of nitrogen conversion of *Bacillus* strain in phase-1 of urea broth

参数	总效应	直接效应	间接效应					未析效应
			gro	*iod*	*ion*	*stage*	合计	
gro	0.38**	0.69***	-	-0.48	-	0.16	-0.31	0.00
iod	0.60***	1.19***	-0.28	-	-0.06	-0.26	-0.59	0.00
ion	-0.05 ^{ns}	0.18***	-	-0.37	-	-0.14	-0.51	0.28
stage	0.11 ^{ns}	-0.36***	-0.31	0.86	-0.07	-	0.48	-0.01



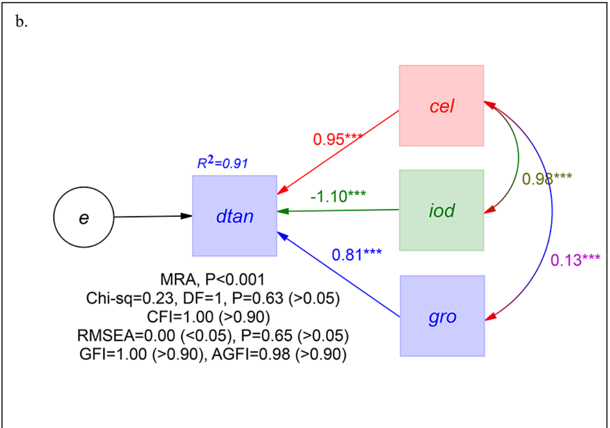


图 3　尿素培养基 phase-2 阶段菌株生长（a）与氮转化（b）通径图

Fig. 3　The path diagrams of growth (a) and nitrogen conversion (b) of *Bacillus* strain in phase-2 of urea broth

表 3　尿素培养基 phase-2 阶段芽孢杆菌生长影响因子的效应剖分

Table 3　The division of factors' effects on growth of *Bacillus* strain in phase-2 of urea broth

参数	总效应	直接效应	间接效应				未析效应
			cel	*dtan*	*itann*	合计	
cel	0.20 ^{ns}	0.23***	-	-	-	-	-
dtan	0.93***	0.49***	-	-	0.43	0.43	0.01
itann	0.90***	0.50***	-	0.42	-	0.42	-0.03

表 4　尿素培养基 phase-2 阶段芽孢杆菌氮转化影响因子的效应剖分

Table 4　The division of factors' effects on nitrogen conversion of *Bacillus* strain in phase-2 of urea broth

参数	总效应	直接效应	间接效应				未析效应
			cel	*gro*	*iod*	合计	
cel	0.04 ^{ns}	0.95**	-	0.11	-1.08	-0.97	0.06
gro	0.93***	0.81***	0.12	-	-	0.12	0.00
iod	-0.10 ^{ns}	-1.10***	0.93	-	-	0.93	0.07

(2) 无机氮源培养基

图 4 显示，在以氯化铵作为唯一氮源的低浓度无机氮源培养基中，也未检测到亚硝酸氮和硝酸氮的产生，仅有氨氮降解的现象，菌株 NT9 降解氨氮浓度由(27.7±4.3) mg·L^{-1} 下降为 24d 的(3.0±0.1) mg·L^{-1}（图 4a），总体的氨氮降解速率为 1.0 mg·L^{-1}·d^{-1}，而菌株 YB3 则使氨氮浓度由(36.8±3.4) mg·L^{-1} 持续下降为 24d 的(3.2±1.1) mg·L^{-1}（图 4b），降解速率 1.4 mg·L^{-1}·d^{-1}。

多元回归分析和通径分析结果显示，芽孢杆菌生长（*gro*）主要受 *cel*、*dtan* 和 *iod* 的影响（P<0.001，R^2 = 0.71，图 5a），而 *gro* 和 *stage* 则对氨氮的转化（*dtan*）起主要作用（P<0.001，R^2 = 0.55，图 5b）。效应剖分显示，*cel* 对 *gro* 直接效应最大（0.73，P<0.001，表 5），而 *dtan* 的总效应最大（0.68，P<0.001，表 5），*iod* 的总效应不显著（P>0.05，表 5）；*gro* 对 *dtan* 的

直接效应和总效应最大（0.51，P<0.001；0.68，P<0.001；表 6），*stage* 也具有显著的总效应（-0.60，P<0.001，表 6）。

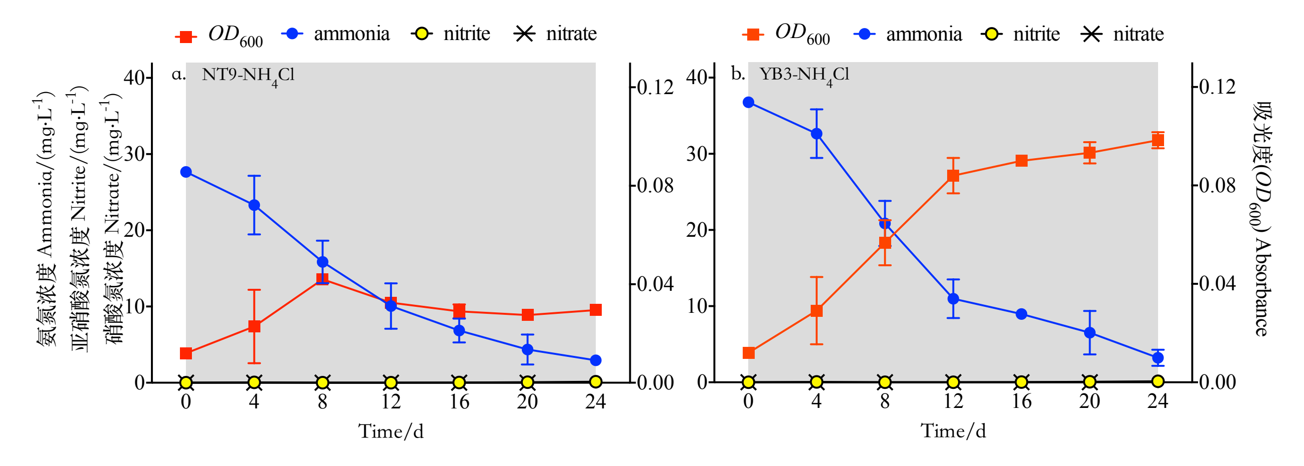


图 4 氯化铵培养基中菌株 NT9 与 YB3 的生长与氮转化情况

Fig. 4 The growth and nitrogen conversion of strain NT9 in broth with NH_4Cl as unique nitrogen source

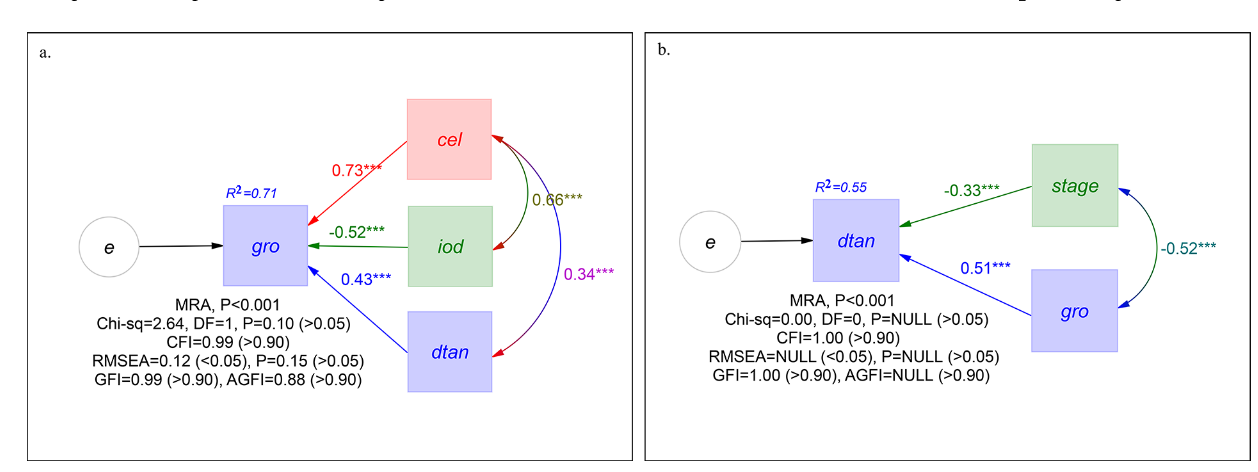


图 5 氯化铵培养基中芽孢杆菌生长（a）与氮转化（b）通径图（NULL 表示缺失，图中模型为饱和模型，自由度为 0，无法计算模型χ^2值、RMSEA 值以及 AGFI 值，也无法进行相关检验(吴明隆, 2018)。）

Fig. 5 The diagram of growth (a) and nitrogen conversion (b) of *Bacillus* strain in NH_4Cl broth

表 5 氯化铵培养基中芽孢杆菌生长影响因子的效应剖分

Table 5 The division of factors' effects on growth of *Bacillus* strain in NH_4Cl broth

参数	总效应	直接效应	间接效应				未析效应
			cel	*dtan*	*iod*	合计	
cel	0.48***	0.73***	-	0.15	-0.34	-0.20	-0.05
dtan	0.68***	0.43***	0.25	-	-	0.25	0.00
iod	-0.15 ^{ns}	-0.52***	0.48	-	-	0.48	-0.11

表 6 氯化铵培养基中芽孢杆菌氮转化影响因子的效应剖分

Table 6 The division of factors' effects on nitrogen conversion of *Bacillus* strain in NH_4Cl broth

参数	总效应	直接效应	间接效应			未析效应
			gro	*stage*	合计	
gro	0.68***	0.51***	-	0.17	0.17	0.00
stage	-0.60***	-0.33***	-0.27	-	-0.27	0.00

3.2 模拟养殖水体中菌株生长与氮转化

表 7 显示，在模拟养殖水体中，接种菌株 NT9 的水体（NT9 水体）和接种菌株 YB3 的水体（YB3 水体）也主要在氨氮浓度和菌株生长（总菌量）存在显著性差别（$P<0.05$）。亚硝酸氮浓度、硝酸氮浓度差异不显著（$P>0.05$），因而均未作为自变量纳入通径分析。多元回归分析和通径分析结果显示，芽孢杆菌生长（*gro*）主要受 *cel*、*iod* 和 *stage* 的影响（$P<0.001$，$R^2=0.75$，图 6a），而氮转化作用（*dtan*）主要受 *cel*、*iod* 和 *ion* 的影响（$P<0.001$，$R^2=0.92$，图 6b）。效应剖分显示，*cel* 对 *gro* 直接效应最大（1.99，$P<0.001$，表 8），*iod* 的总效应最大（-0.69，$P<0.001$，表 8），但是 *cel* 和 *stage* 的总效应均不显著（$P>0.05$，表 8）；*ion* 对 *dtan* 的直接效应和总效应均最大（0.94，$P<0.001$；0.87，$P<0.001$；表 9），*cel* 和 *iod* 的总效应也显著（0.28，$P<0.01$；0.21，$P<0.05$；表 9）。

表 7　2 种模拟养殖水体的水质

Table 7　Water quality indices of two different water bodies

水质参数	NT9 水体	YB3 水体
氨氮浓度/(mg·L^{-1})	8.17 ± 2.33^{a}	11.69 ± 2.89^{b}
总菌量/(×10^{5} cfu·ml^{-1})§	3.46 ± 2.39^{a}	25.43 ± 8.84^{b}
亚硝酸氮浓度/(mg·L^{-1})	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.03
硝酸氮浓度/(mg·L^{-1})	0.27 ± 0.33	0.31 ± 0.45

注：§数据进行 $\log_{10}$()转换后进行显著性检验

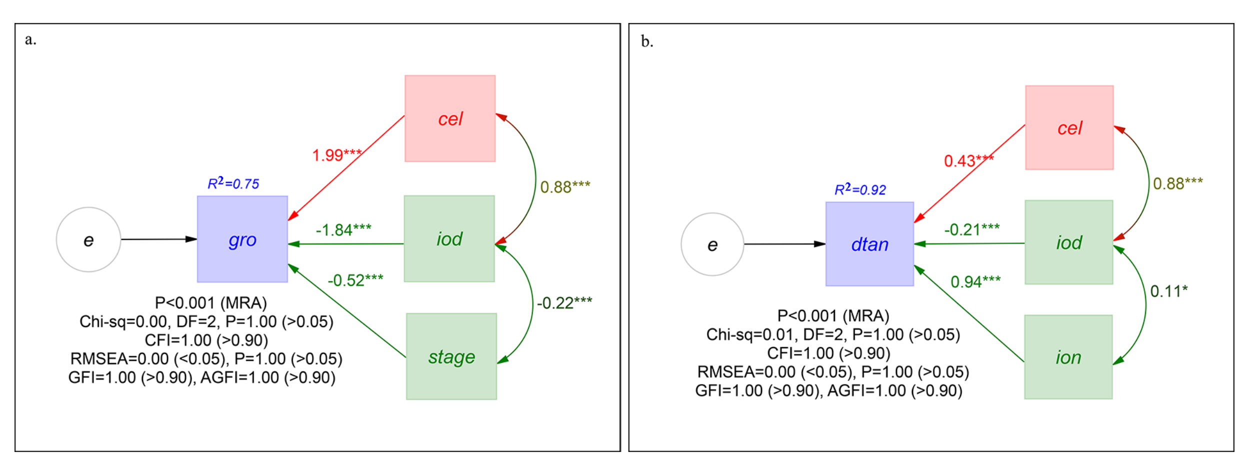


图 6　模拟养殖水体中芽孢杆菌生长（a）与氮转化（b）通径图

Fig. 6　The path diagram of growth (a) and nitrogen conversion (b) of *Bacillus* strain in simulated aquaculture water body

表 8　模拟养殖水体中芽孢杆菌生长影响因子的效应剖分

Table 8　The division of factors' effects on growth of *Bacillus* strain in simulated aquaculture water body

参数	总效应	直接效应	间接效应				未析效应
			cel	*iod*	*stage*	合计	
cel	0.05 ^{ns}	1.99***	-	-1.62	-	-1.62	-0.32
iod	-0.69***	-1.84***	1.75	-	0.11	1.87	-0.72
stage	-0.17 ^{ns}	-0.52***	-	0.40	-	0.40	-0.60

4　讨论

4.1　菌株活性、生长能力与氮转化作用分析与比较

菌株 NT9 具有较强的蛋白酶和淀粉酶活性，菌株 YB3 蛋白酶和淀粉酶活性较弱，而纤维素酶活性较强（黄海洪等，2022）。芽孢杆菌具有多种生理功能，如分泌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等多种酶类(Rafael Martinez-Cordova *et al.*, 2017)，但与原始生境有关，不同的自然生态环境支持不同的优势菌种(康鹏亮等, 2018)，可能进化出不同的活性。菌株 NT9 从腊八豆中分离得到，这种发酵食品含有丰富的大豆蛋白、淀粉等物质，有利于蛋白酶和淀粉

酶活性强的菌株的生长(Anand *et al.*, 2014; Crab *et al.*, 2010)，如许多从发酵食品（如豆豉、纳豆等）中分离的芽孢杆菌也都具有强烈的水解酶活性(吉美萍等, 2016)。而菌株 YB3 分离自养殖水体，营养水平较低，酶的需求可能相对较弱。但是，上述差异也使菌株 NT9 对低营养环境的适应能力较差，生长期较短，生长量也较小。例如，在尿素培养基中，起始接种量相同的情况下（OD_{600} 为 0.010），菌株 NT9 的生长在 8d 即达到峰值(0.041±0.007)（图 1a），而菌株 YB3 则延长至 12d，而且峰值为(0.113±0.004)，远高于菌株 NT9（图 1b）。在低浓度 NH_4Cl 培养液中也具有相似的生长结果，菌株 NT9 的生长达峰时间为 8d，峰值(0.042±0.001)(图 4a)，而菌株 YB3 为 24d 和(0.098±0.003)（图 4b）。

表 9　模拟养殖水体中芽孢杆菌氮转化影响因子的效应剖分

Table 9　The division of factors' effects on nitrogen conversion of *Bacillus* strain in simulated aquaculture water body

参数	总效应	直接效应	间接效应				未知效应
			cel	*iod*	*ion*	合计	
cel	0.28**	0.43***	-	-0.18	-	-0.18	0.03
iod	0.21*	-0.21***	0.38		0.10	0.48	-0.06
ion	0.87***	0.94***	-	-0.02	-	-0.02	-0.05

在整个试验过程中，接种菌株 NT9 的 NH_4Cl 培养基中的氨氮浓度持续下降，但未见亚硝酸氮和硝酸氮生成（图 4a），说明菌株 NT9 也主要通过同化作用转化氨氮，而不具有硝化、亚硝化的功能(Ebeling *et al.*, 2006)，这与菌株 YB3 的氮转化作用（图 4b）以及前期研究结果一致(黄海洪等, 2018)。以纯培养过程为例，在尿素培养基 phase-1 阶段，菌株 NT9 使氨氮浓度由开始的(0.4±0.1) mg·L^{-1} 上升至 16d 的(19.8±1.6) mg·L^{-1}（图 1a），总体的氨氮生成速率为 1.2 mg·L^{-1}·d^{-1}，而菌株 YB3 则使氨氮浓度由(0.6±0.1) mg·L^{-1} 上升至 8d 的(27.7±3.0) mg·L^{-1}（图 1b），生成速率 3.4 mg·L^{-1}·d^{-1}，约为前者的 3 倍。在氯化铵培养基，菌株 NT9 降解氨氮，浓度由(27.7±4.3) mg·L^{-1} 下降为 24d 的(3.0±0.1) mg·L^{-1}（图 4a），总体的氨氮降解速率为 1.0 mg·L^{-1}·d^{-1}，菌株 YB3 则使氨氮浓度由(36.8±3.4) mg·L^{-1} 持续下降为 24d 的(3.2±1.1) mg·L^{-1}（图 4b），降解速率 1.4 mg·L^{-1}·d^{-1}，也稍高于前者。

因此，总体来看，菌株 NT9 的水解酶活性和抑菌活性较强，但是对低营养环境的适应性较差，生长能力以及有机氮和氨氮降解能力均低于菌株 YB3。

4.2　通径分析模型评价

通径分析出了构建和路径，还包括模型的评价。其中，最有效和最常用的评价指标主要有 Chi-sq、CFI、RMSEA、GFI 和 AGFI 等(吴明隆, 2018; 易丹辉, 2008)。其中，Chi-sq (Chi-square, χ^2)为卡方值，表示模型与原始数据的差异程度，因此越小越好，另外在一定自由度（DF）下，也可以进行显著性假设检验，如果其对应的 P>0.05，也说明模型拟合数据与原始数据差异不显著；CFI（comparative fit index）比较拟合指数，表示模型与饱和模型（即最佳模型）接近程度，一般情况下 0≤CFI≤1，CFI 越接近 1，说明模型与数据越适配，CFI>0.90 即可判定路径模型可以与数据适配；RMSEA（root mean square error of approximation）为渐进残差均方根，表示模型拟合数据与原始数据的残差大小，其值越小表示模型的适配度越高，当模型与数据完全适配时，RMSEA 值为 0，RMSEA≤0.05 表示模型适配度好，也可以对 RMSEA 进行假设检验，如果 P>0.05，接受无效假设，即 RMSEA≤0.05；GFI（goodness of fit index）适配度指数，表示模型可以解释数据变异量的程度，AGFI（adjusted goodness of fit index）调整适配度指数，为无量纲指标，两者取值范围均为[0，1]，越接近 1，表示模型可以解释数据变异的程度越大，模型可以被接受的判定标准为 GFI>0.90 和 AGFI>0.90。本文所有模型的卡方检验结果、CFI 值和 GFI 值都符合上述评价标准（图 2、3、5 和 6），表明模型能够很好地反映数据的变异。仅有少数几个模型的 RMSEA 值大于 0.05，AGFI 值低于 0.90（图 2a、3a 和 6a），但是其 RMSEA 假设检验结果并不显著（P>0.05，图 2a、3a 和 6a），表明并不能拒绝 RMSEA≤0.05 的假设，同时 AGFI 值也均在 0.80 以上（0.80-0.88，图 2a、3a 和 6a），与 0.90 的最低标准相差不大，因此能够用来拟合数据(吴明隆, 2018)。另外，各条路径上的系数以及所有的多元回

归分析（Multiple Regression Analysis，MRA）模型也都达到显著或极显著水平（$P<0.05$ 或 $P<0.01$，图 2、3、5 和 6），具有统计学意义，同时模型的决定系数（R^2）也达到较高的 0.55-0.95，均表明模型中的自变量（菌株特性和环境因素）的综合作用对因变量（芽孢杆菌的生长和氮转化）具有重要影响。

4.3 不同环境中芽孢杆菌生长与氮转化差异

本研究共配置了 3 种液体介质，有机氮（尿素）和无机氮（氯化铵）唯一氮源低营养培养基，以及模拟养殖水体。其中，尿素培养基中又分为 phase-1 和 phase-2 两个阶段，主要根据氨氮含量的峰值进行划分（图 1）。因此，本次研究实际共有 4 种培养环境，主要在起始接种量，氮源种类、投入量和投入方式，以及氮转化方向（表现为氨氮的生成或降解）等方面存在差异（表 10），而这可能导致不同环境中芽孢杆菌生长与氮转化的差异。首先，体现在模型决定系数（R^2）的不同（图 2、3、5 和 6）。总体来看，尿素培养基（phase-1 和 phase-2）的模型都能达到较高的 R^2（0.91-0.95，图 2 和图 3），预测性较强，而氯化铵培养基和模拟养殖水体则相对较低（0.55-0.92，图 5 和图 6）。从投入的氮源种类来看，尿素培养基 phase-1 和模拟养殖水体较为相似（表 10），由于前者为封闭式的纯培养环境，与后者的开放式培养环境，单一菌种的生长是较可预期的，因而可预测性高。尿素培养基 phase-2 和氯化铵培养基都是以氨氮为氮源的环境，前者预测性较高可能是因为已经累积了较高的菌量，菌群处于较稳定的状态（图 1），与此相反，后者起始菌量较少，还不稳定，因而不可预测性较高。另外，在这两种环境中，氨氮的转化主要通过菌株的同化作用进行（图 4）(Ebeling *et al.*, 2006; 黄海洪等, 2018)，处于较稳定状态的菌群可能同化氨氮的机制也比较稳定。其次，不同环境中，纳入模型的自变量也不尽相同（图 2、3、5 和 6），表明芽孢杆菌的生长与其氮转化功能的发挥对环境比较敏感。

表 10 4 种环境条件主要差异

Table 10 Differences among four environments

项目	尿素培养基		氯化铵培养基	模拟养殖水体
	phase-1	phase-2		
起始菌量	低	高	低	高
无机氮（氨氮）投入量	无	高	高	无
有机氮投入量	高	无	无	低
氮源投入方式	一次性	累积生成	一次性	持续多次
氨氮去向	生成	降解	降解	生成

4.4 菌株活性和环境因素对芽孢杆菌生长与氮转化作用的影响

(1) 菌株活性的直接效应

通径分析显示，纤维素酶活性对菌株生长（*gro*）具有显著的促进作用（$P<0.001$，图 2a、3a、5a 和 6a），同时对有机氮（7b 和表 10）和氨氮（图 3b 和表 10）的降解（*dtan*）也都具有显著的促进作用（$P<0.001$）。纤维素酶对微生物具有重要的意义，较高的纤维素酶活性可以提高纤维素的利用效率，而纤维素则能够作为益生元促进微生物的生长(Qin *et al.*, 2016)，并能够降低水体氨氮浓度(Deng *et al.*, 2018)。但是，蛋白酶和淀粉酶活性并未对 *gro* 或 *dtan* 表现出显著影响。研究表明，虽然有机氮的降解与微生物分泌的酶具有一定的关系(周广静等, 2017)，但是可能也与水体中微生物的其它活动有关(张庆华等, 2011)，李木明 (2016)和闫法军等 (2013)均发现，有机氮降解率最高的芽孢杆菌，水解酶活力并不很高。

抑菌活性对 *gro* 和 *dtan* 均未表现出显著影响。因为本研究仅针对少数几种水产病原菌测定菌株的抑菌活性，纯培养环境中缺乏作用对象，抑制作用可能并未发生。同样，在模拟养殖过程中，绝大多数的也是非病原微生物，如变形菌、拟杆菌等(Cardona *et al.*, 2016; 于永翔等, 2017)。前期研究也显示，在未接种芽孢杆菌的对照模拟养殖水体中，总菌量可以在 8d 内迅速增长到 5.82×10^5 cfu·ml^{-1} (黄海洪等, 2019)。同时，NT9 水体总菌量下降，而 YB3 水体增加（表 7），也可能与两株菌对非病原菌抑制作用的强弱有关。因此，此次研究所采用的抑菌

活性并不能代表对水体中其它微生物的抑制能力，下一步还需要对水体微生物的总体抑制活性进行测定，才能最终确定抑菌活性对菌株生长和氮转化作用的影响。

但是，应该注意的是，此次研究的各种活性只是作为菌株固有的特性，并不是试验过程中实时、动态的活力，两者仅仅是名称相同，内涵却是不同的。因此，上述研究结果只能说明前者可能在菌株筛选中的指示意义，而并不能直接否定后者实际活性的作用。

（2）环境因素的直接影响

本次研究中，主要有 4 个环境因素作为自变量纳入了通径分析，起始菌量（*iod*）、起始有机氮含量（*ion*）、起始无机氮含量（*itann*）和时间阶段（*stage*）。模拟养殖水体的其它水质条件，如亚硝酸氮浓度、硝酸氮浓度、温度、溶解氧、pH、盐度、碱度和硬度等，因为水体间的差异不显著（$P>0.05$，表 7），也均未作为纳入分析。*iod* 对 *gro* 具有显著的消极影响（$P<0.001$，图 2a、5a 和 6a），与前期的水体总菌量（起始菌量 ）对微生物的增殖具有负效应研究结果一致(黄海洪等, 2019)，推测可能也与营养竞争有关，因为本次研究的培养环境均处于低营养水平。但是，*iod* 对尿素培养基 phase-2 的 *gro* 影响不显著（图 3a），可能与该环境条件下菌株生长处于稳定状态、菌量变化不大有关（图 1）。同时，*iod* 对 *dtan* 也具有显著的影响（$P<0.05$ 或 $P<0.001$），表现为在尿素培养基 phase-1 促进氨氮的生成（图 2b），这是由于菌量增加，氨化作用也将增强的缘故，但是在模拟养殖水体却表现为抑制氨氮的生成(图 6b)，可能与该环境接种量较大，氮源分批投入，投入量相对较低（表 10），因而存在营养竞争，产生的氨氮可能又部分被同化等有关。研究表明，根据环境条件调整芽孢杆菌的投加量或投加方式，如改变使用剂量（Dosages）和周期（Time duration），能够达到更好的使用效果(Hai, 2015)。*iod* 在尿素培养基 phase-2 也抑制氨氮的降解（图 3b），可能是因为该阶段菌量较大，代谢量大，排放的氨氮量较多(乐毅全和王士芬, 2011)，因而中和了一部分降解的氨氮量。

ion 代表了环境的有机氮源状况，但只存在于尿素培养基 phase-1 和模拟养殖水体（表 10）。*ion* 仅对 phase-1 的 *gro* 具有抑制作用（$P<0.001$，图 2a），在此阶段，*ion* 为一次性投入（表 10），表明这种投加方式可能对菌株后期的生长影响不利，因为前期菌量较小，氮源需求量也少，一次性投加可导致氮源过剩，而随着菌株的生长，对氮源的需求越来越多，却没有氮源补充投入，因而对生长产生抑制。同时，*ion* 也能够积极影响这两种环境中的 *dtan*（$P<0.001$，图 2b 和图 6b），但是在模拟养殖水体中的效应更强，表明氮源的投入及其方式能够加强氨化作用，说明也可以对 *ion* 的投加量或投加方式进行调整，以促进芽孢杆菌使用效果，这与调整菌株剂量（Dosages）加强使用效果的操作相似(Hai, 2015)。*itann* 代表了环境的氨氮无机氮源的状况，但仅对尿素培养基中的 *gro* 具有显著影响（$P<0.001$，图 2a 和图 3a）。在 phase-1 中，氨氮不作为菌株生长的主要氮源，而是生长代谢的副产物，氨氮增加，意味着用于生长的氮量是减少的(乐毅全和王士芬, 2011)，因而 *itann* 对菌株生长呈现负作用（图 2a）。在 phase-2 中，氨氮则是菌株生长的主要氮源，因而能够显著促进 *gro*（$P<0.001$，图 3a）。但是在与 phase-2 氮源情况相似的氯化铵培养基中（表 10），*itann* 对 *gro* 并未表现出显著的影响，主要是其起始菌量较低，营养较充足，竞争较小，*itann* 不是限制生长的因素。

stage 为时间阶段，是微生物增殖能力、功能活性和营养水平的综合反映，与微生物增殖及功能活性的衰退成正比，也一定程度上反映了营养物质的消耗(黄海洪等, 2019)，因而对 *gro* 和 *dtan* 都表现出显著的不利影响（$P<0.001$，图 2b、图 5b 和图 6a）。

（3）菌株活性与环境因素的交互作用（间接效应）

菌株活性和环境因素除了对 *gro* 与 *dtan* 具有直接的作用，还表现出一定的间接效应。例如，纤维素酶活性（*cel*）主要与 *ion*（图 2a）和 *iod*（图 3b、图 5a、图 6a 和图 6b）等表示氮源水平、微生物含量的环境因素具有显著的相关关系（$P<0.001$），对 *gro* 和 *dtan* 产生间接影响（表 1、表 4、表 5、表 8 和表 9）。这与水解酶水解营养物质，提高营养物质的可利用性，从而有利于微生物的吸收、生长的作用方式一致(乐毅全和王士芬, 2011)。同时，环境因素之间，例如微生物含量因素（*iod*）、氮源水平因素（*itann* 和 *ion*）与时间阶段因素（*stage*）三者之间的具有显著的相关关系（$P<0.05$，图 2a、b 和图 6a、b），进而对 *gro* 和 *dtan* 产生间接影响（表 1、表 2、表 8 和表 9）。这都体现了微生物与环境之间的互作关系。但是，不同的环境

中菌株活性与环境因素相互作用的方式也不一样，如尿素培养基 phase-1 中，*cel* 与 *ion* 正相关，与 *iod* 无显著相关（图 2a），而在模拟养殖水体中，*cel* 与 *iod* 正相关（图 6a、b），说明不同环境条件影响菌株活性的作用方式。

虽然尚不能对间接效应进行显著性检验(吴明隆, 2018)，但总体来看，*ion* 和 *iod* 较大地减弱了 *cel* 对 *gro* 的促进作用，反之，*cel* 也能够减弱 *ion* 和 *iod* 对 *gro* 的抑制作用（表 1、表 5 和表 8）。同时，*iod* 也能够减弱 *stage* 对 *gro* 的抑制作用（表 8）。*iod* 还减弱 *ion*（表 2）和 *cel*（表 4）对 *dtan* 的促进作用，反之 *cel* 则减弱 *iod* 对 *dtan* 的抑制作用（表 4 和表 9）。另外，*iod* 也能够减弱 *stage* 对 *dtan* 的抑制作用，相反 *stage* 则减弱 *iod* 对 *dtan* 的促进作用（表 2）。这些结果表明，菌株活性与环境因素之间的相互关系对芽孢杆菌生长与功能具有复杂的影响。

（4）菌株活性和环境因素的综合效应

综合来看，对 *gro* 的总效应达到显著水平的菌株活性和环境因素，在尿素培养基 phase-1 为 *cel*（0.64，P<0.001）和 *iod*（-0.40，P<0.01，表 1），phase-2 为 *itann*（0.90，P<0.001，表 3），氯化铵培养基为 *cel*（0.48，P<0.001，表 5），模拟养殖水体为 *iod*（-0.69，P<0.001，表 8）。与此同时，phase-1 的 *itann*（表 1）、phase-2 中 *cel*（表 3）、氯化铵培养基 *iod*（表 5）和模拟养殖水体 *cel*（表 8）等的总效应均不显著。上述结果表明，菌株活性因素 *cel* 可能主要在起始接种量较低的环境（尿素培养基 phase-1 和氯化铵培养基，表 10）中起促进作用，且与氮源种类无关，而 *iod* 则主要在有机氮源环境（尿素培养基 phase-1 和模拟养殖水体，表 10）中抑制菌株的生长，与模拟养殖水体菌量对微生物的增殖具有显著的综合性负效应的前期研究结果一致(黄海洪等, 2019)。

类似地，对 *dtan* 的总效应达到显著水平的菌株活性和环境因素，在尿素培养基 phase-1 为 *iod*（0.60，P<0.001，表 2），氯化铵培养基 *stage*（-0.60，P<0.001，表 6），模拟养殖水体 *cel*（0.28，P<0.01）、*iod*（0.21，P<0.05）和 *ion*（0.87，P<0.001，表 9），同时 phase-1 中 *ion*（表 2）以及 phase-2 中 *cel* 和 *iod*（表 4）的总效应均不显著。这些结果表明 *iod* 能够在有机氮源环境（尿素培养基 phase-1 和模拟养殖水体，表 10）中促进有机氮的降解，因为 *iod* 高意味着参与氨化作用的菌量也多，同时也表明 *cel* 和 *ion* 可能仅在菌量较高的有机氮源环境（模拟养殖水体，表 10）中对有机氮的降解产生敏感的影响，因为菌量较高，存在营养竞争，营养为限制性因素。

在通径分析中，自变量对因变量的总效应即是两者的相关系数(杜家菊和陈志伟, 2010)，而本研究结果显示，在各路径中作用均显著的因子（自变量），对因变量的总效应也不一定显著，说明在研究分析过程中单纯采用相关分析并不能充分、有效地揭示自变量对因变量的影响，也表明了通径分析的巨大优势。

4.5 菌株生长与氮转化之间的相互关系

芽孢杆菌生长与氮转化作用彼此之间也相互直接影响。首先，*gro* 在纯培养基中对 *dtan* 具有直接的显著积极影响（P<0.001，图 2b、3b 和 6b）。具体来看，在尿素培养基 phase-2 阶段和氯化铵培养基中，*gro* 对 *dtan* 均具有促进作用（图 3b 和 6b），在两种环境中，氨氮为主要氮源或唯一氮源，菌株通过同化氨氮进行生长(乐毅全和王士芬, 2011)，因而会导致氨氮含量下降。与尿素培养基 phase-1 中，*gro* 对 *dtan* 也表现出促进作用（图 2b），但是在模拟养殖水体未表现出显著的影响（图 6b），可能是因为模拟养殖水体起始接种量较大，整个试验过程菌群比较稳定，未有足够大的菌量变已引起 *dtan* 的显著变化。其次，*dtan* 对 *gro* 也具有直接的显著促进作用，但仅限于尿素培养基 phase-2 和氯化铵培养基（P<0.001，图 3a 和图 5a）。主要是因为在这两种环境中，氨氮为主要氮源或唯一氮源，同化的氨氮降解直接转化为菌株的生长，因而 *dtan* 表现出对 *gro* 的显著影响。

另外，*gro* 和 *dtan* 也能够相互间接影响。首先，*gro* 通过菌株活性（*cel*，表 4）或环境因素（*iod*，表 2；*stage*，表 2 和表 6）对 *dtan* 产生间接影响。*gro* 与 *cel* 具有正相关关系（图 3b），与 *iod*（图 2b）和 *stage*（图 2b 和图 5b）均为负相关关系，这与水解酶增强营养物质可利用性、有利生长，而菌量增加和时间延长则加剧了竞争。但是，与尿素培养基 phase-1（图

2b）不同，在 phase-2，*gro* 与 *iod* 并未表现出显著的相关关系（图 3b），可能与该阶段菌量较高、处于稳定状态有关（图 1 和表 10）。其次，*dtan* 也能够通过 *cel*（图 5a 和表 5）或 *itann*（图 3a 和表 3）间接影响 *gro*，当然也仅限于以氨氮为主要氮源或唯一氮源的尿素培养基 phase-2（图 3a）以及氯化铵培养基（图 5a）。*gro* 对 *dtan* 相互间接影响最终主要体现为，*dtan* 通过 *itann*（表 3）和 cel（表 5）较大地增强对 *gro* 的促进作用，并增强 *itann* 对 *gro* 的促进作用（表 3），而 *gro* 也能够通过 *iod* 减弱对 *dtan* 的促进作用（表 2），同时增强 stage 对 *dtan* 的抑制作用（表 2 和表 6），并减弱 *iod* 对 *dtan* 的促进作用（表 2）。

综合来看，*gro* 对 *dtan* 相互作用的总效应均达到显著水平（$P<0.01$，表 2-8），如在尿素培养基 phase-2 和氯化铵培养基（表 5）中，*dtan* 对 *gro* 的总效应为 0.93 和 0.68（$P<0.001$，表 3；$P<0.001$，表 5）。*gro* 对 *dtan* 的总效应达到显著水平的，分别为尿素培养基 phase-1 和 phase-2 的 0.38 和 0.93（$P<0.01$，表 2；$P<0.001$，表 4），以及氯化铵培养基的 0.68（$P<0.001$，表 6）。

综上所述，芽孢杆菌生长与氮转化作用比较复杂，除了受菌株活性和环境因素的影响外，彼此之间也相互影响，使它们的关系呈现一定的结构性，对此还需要采用结构方程模型进行深入研究。

5 结论

（1）通径分析显示，模型的决定系数可达 0.55-0.95，表明菌株特性和环境因素的综合作用对低营养水体中芽孢杆菌的生长和氮转化作用具有重要影响。例如，菌株纤维素酶活性（*cel*）对芽孢杆菌生长（*gro*）和氮转化（*dtan*）具有直接的显著积极影响（$P<0.001$），而水体起始的菌量（*iod*）和有机氮含量（*ion*）的影响则受环境条件的制约，提示在实际应用过程中，可能需要结合环境条件拟定菌株、氮源等的投加量和投加方式，以达到更好的使用效果。

（2）分析也显示，菌株活性与环境因素具有交互作用（$P<0.05$），对 *gro* 和 *dtan* 产生间接效应。同时，gro 和 dtan 相互之间也具有直接的促进效应（$P<0.001$），并且可以通过菌株特性或环境因素对彼此产生间接效应，表明两者的关系具有一定的结构性，还需要应用结构方程模型进一步研究。

责任作者简介：黄海洪，男，博士，副教授，主要从事养殖水体微生态调控与循环利用等方面的研究。

参考文献：

Anand P S S, Kohli M P S, Kumar S, *et al.* 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 418: 108-115

Avnimelech Y and Kochba M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using 15 N tracing [J]. Aquaculture, 287 (1): 163-168

Burford M A and Williams K C. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding [J]. Aquaculture, 198 (1): 79-93

Cardona E, Gueguen Y, Magre K, *et al.* 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system [J]. BMC Microbiology, 16: 1-9

Crab R, Chielens B, Wille M, *et al.* 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae [J]. Aquaculture Research, 41 (4): 559-567

Deng M, Chen J, Hou J, *et al.* 2018. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems [J]. Aquaculture, 482: 103-110

杜家菊和陈志伟. 2010. 使用 SPSS 线性回归实现通径分析的方法 [J]. 生物学通报, 45 (2): 4-6

Ebeling J M, Timmons M B and Bisogni J J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems [J]. Aquaculture, 257 (1–4): 346-358

Elsabagh M, Mohamed R, Moustafa E M, *et al.* 2018. Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture Nutrition, 24(6): 1613-1622

Ferreira M G P, Melo F P, Lima J P V, *et al.* 2017. Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc [J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 45 (1): 167-176

Fungesmith S J and Mrp B. 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability [J]. Aquaculture, 164 (1–4): 117-133

Gao J, Gao D, Liu H, *et al.* 2018. Biopotentiality of high efficient aerobic denitrifier *Bacillus megaterium* S379 for intensive aquaculture water quality management [J]. Journal of Environmental Management, 222: 104-111

国家环境保护总局. 2002. 水和废水监测分析方法（第四版） [M]. 北京：中国环境出版社. 258-285

Hai N V. 2015. The use of probiotics in aquaculture [J]. Journal of Applied Microbiology, 119 (4): 917-935

黄海洪，陈倩，类延菊，等. 2019. 低营养水体中芽孢杆菌降解有机氮的研究 [J]. 环境科学学报, 39 (2): 325-335

黄海洪，贺莉，类延菊，等. 2018. 一株芽孢杆菌在低氮源浓度培养基中的生长与氨氮去除特性 [J]. 环境科学学报, 38 (1): 183-192

黄海洪，李朝云，类延菊，等. 2022. 芽孢杆菌特性对养殖水体氮转化作用的影响 [J]. ChinaXiv, DOI：10.12074/202205.00108

吉美萍，肖志婷，那日，等. 2016. 纳豆芽孢杆菌的相关研究进展 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 44 (5): 83-93

康鹏亮，张海涵，黄廷林，等. 2018. 湖库沉积物好氧反硝化菌群脱氮特性及种群结构 [J]. 环境科学, 39(5): 1-10

Lara G, Krummenauer D, Abreu P C, *et al.* 2017. The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition [J]. Aquaculture International, 25 (1): 147-162

李木明. 降解有机质芽胞杆菌的筛选及其净化模拟污染水体的特性 [D]. 厦门：华侨大学, 2016.

Lin Y and Chen J. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 259 (1): 109-119

Lin Y C and Chen J C. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels [J]. Aquaculture, 224 (1): 193-201

Luo G, Wang J, Ma N, *et al.* 2016. Effects of inoculated *Bacillus subtilis* on geosmin and 2-methylisoborneol removal in suspended growth reactors using aquacultural waste for biofloc production [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 26 (8): 1420-1427

Piedrahita R H. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation [J]. Aquaculture, 226 (1): 35-44

Prata Gaona C A, de Almeida M S, Viau V, *et al.* 2017. Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation [J]. Aquaculture Research, 48 (3): 1070-1079

齐振雄，李德尚，张曼平，等. 1998. 对虾养殖池塘氮磷收支的实验研究 [J]. 水产学报, 22(2): 124-128

Qin Y, Hou J, Deng M, *et al.* 2016. Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds [J]. Scientific Reports, 6(35232):1-13

Rafael Martinez-Cordova L, Martinez-Porchas M, Coelho Emerenciano M G, *et al.* 2017. From microbes to fish the next revolution in food production [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 37 (3): 287-295

吴明隆. 2018. 结构方程模型——AMOS 的操作应用（第二版） [M]. 重庆：重庆大学出版社. 1-517

谢凤行，张峰峰，周可，等. 2012. 一株解淀粉芽胞杆菌的分离鉴定及水质净化效果的研究 [J]. 环境科学学报, 32 (11): 2781-2788

薛宝宝，李浩，牛东红，等. 2018. 不同月龄缢蛏新品种数量性状的相关与通径分析 [J]. 水产学报, 42 (6): 941-949

闫法军，田相利，董双林，等. 2013. 刺参养殖池塘降解有机污染物常、低温芽孢杆菌的分离筛选 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版)自然科学版, 43 (6):

Yang X P, Wang S M, Zhang D W, *et al.* 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1 [J]. Bioresour Technology, 102 (2): 854-862

易丹辉. 2008. 结构方程模型方法与应用 [M]. 北京：中国人民大学出版社. 1-208

Yu C H, Wang Y, Guo T, *et al.* 2012. Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from industrial wastewater [J]. Engineering, 790-793

于永翔，姜燕，张正，等. 2017. 添加外源益生菌对大菱鲆育苗生物饵料菌群结构的影响 [J]. 水产学报, 41 (4): 602-612

乐毅全和王士芬. 2011. 环境微生物学（第二版） [M]. 北京：化学工业出版社. 1-246

张庆华，封永辉，王娟，等. 2011. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究 [J]. 水生生物学报, 35 (3): 498-503

周广静, 张晓波, 朱笔通, 等. 2017. 海洋着色菌 YL28 对含沉积物的海水养殖水体氮污染去除效应的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 39(6): 441-447

(通讯作者: 黄海洪 E-mail:shinkanh@nwafu.euc.cn; 李朝云 E-mail:cyzyli@163.com)

作者贡献声明：

黄海洪，李朝云：提出研究思路，设计研究方案，分析数据，论文起草；
类延菊，邹万生，武孟祥：实验，采样，测定；
杨品红：论文最终版本修订。